

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003179

International filing date: 04 December 2004 (04.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0087552
Filing date: 04 December 2003 (04.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 January 2005 (03.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

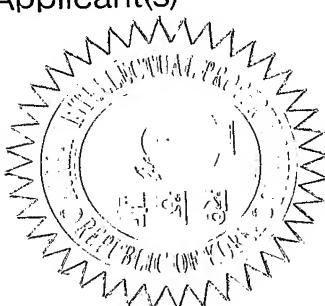
This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0087552
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 04일
Date of Application

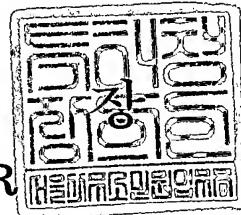
출 원 인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.

2004년 11월 17일



특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

| | |
|------------|---|
| 【서류명】 | 특허출원서 |
| 【권리구분】 | 특허 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【참조번호】 | 0016 |
| 【제출일자】 | 2003.12.04 |
| 【국제특허분류】 | A61K |
| 【발명의 명칭】 | 인터페론 베타의 정제방법 |
| 【발명의 영문명칭】 | Processes for the purification of interferon beta |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 씨제이 주식회사 |
| 【출원인코드】 | 1-1998-003466-9 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 이영필 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000334-6 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2003-042214-4 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 이태호 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000335-2 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2003-042215-1 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 오국진 |
| 【대리인코드】 | 9-1999-000562-6 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2003-042218-3 |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 박지숙 |
| 【성명의 영문표기】 | PARK, Ji Sook |
| 【주민등록번호】 | 720504-2030917 |
| 【우편번호】 | 139-220 |
| 【주소】 | 서울특별시 노원구 중계동 시영아파트 101동 801호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 정종상 |
| 【성명의 영문표기】 | CHUNG, Jong Sang |

| | |
|------------|---|
| 【주민등록번호】 | 681117-1009333 |
| 【우편번호】 | 137-769 |
| 【주소】 | 서울특별시 서초구 반포4동 미도아파트 302동 1107호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 백민지 |
| 【성명의 영문표기】 | BAEK,Min Ji |
| 【주민등록번호】 | 790131-2822215 |
| 【우편번호】 | 449-709 |
| 【주소】 | 경기도 용인시 김량장동 현대아파트 106동 101호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 안지원 |
| 【성명의 영문표기】 | ahn,Jee Won |
| 【주민등록번호】 | 760421-2011717 |
| 【우편번호】 | 138-787 |
| 【주소】 | 서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트2단지 249동 602호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 김기완 |
| 【성명의 영문표기】 | KIM,Ki Wan |
| 【주민등록번호】 | 680104-1641914 |
| 【우편번호】 | 120-110 |
| 【주소】 | 서울특별시 서대문구 연희동 740번지 연희동성원아파트 101동 208호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 박형기 |
| 【성명의 영문표기】 | PARK,Hyung Ki |
| 【주민등록번호】 | 730718-1405216 |
| 【우편번호】 | 137-073 |
| 【주소】 | 서울특별시 서초구 서초3동 1490-3 상지리츠빌 401호 |
| 【국적】 | KR |

【발명자】

【성명의 국문표기】

이동억

【성명의 영문표기】

LEE, Dong Eok

【주민등록번호】

630909-1009615

【우편번호】

138-162

【주소】

서울특별시 송파구 가락2동 프라자아파트 10동 807호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

오명석

【성명의 영문표기】

OH, Myung Suk

【주민등록번호】

580826-1029927

【우편번호】

442-470

【주소】

경기도 수원시 팔달구 영통동 미주아파트 651동 806호

【국적】

KR

【심사청구】

청구

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인

이영필 (인) 대리인

이태호 (인) 대리인

오국진 (인)

【수수료】

【기본출원료】 17 면 29,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 5 항 269,000 원

【합계】 298,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 친화성 크로마토그래피 공정 및 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정을 포함하는 재조합 인체 인터페론 베타-함유 배양액으로부터 인체 인터페론 베타의 정제방법에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 공정이 평형화된 친화성 크로마토그래피 컬럼에 인터페론 베타-함유 배양액을 가하여 흡착시킨 다음, 평형용 완충용액으로 세척하는 단계; 30 ~ 60 중량%의 프로필렌 글리콜로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 A) 및 10 ~ 30 중량%의 프로필렌 글리콜 및 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 B)으로 컬럼을 세척하는 단계; 및 40 ~ 60 중량%의 프로필렌 글리콜 및 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액으로 인체 인터페론 베타를 함유하는 분획을 용출시키는 단계를 포함하는 인체 인터페론 베타의 정제방법을 제공한다.

【대표도】

도 1

【색인어】

인터페론 베타, 친화성 크로마토그래피, 역상 고속 액체 크로마토그래피

【명세서】

【발명의 명칭】

인터페론 베타의 정제방법{Processes for the purification of interferon beta}

【도면의 간단한 설명】

도1은 본 발명의 정제방법의 단계별 공정 흐름도이다.

도2는 본 발명의 정제방법에서 친화성 크로마토그래피 공정에서 용출된 인터페론 베타의 C4 RP-HPLC 분석 크로마토그램이다.

도3은 50% 프로필렌 글리콜 세척단계가 없는 공정으로 용출한 인터페론 베타의 C4 RP-HPLC 분석 크로마토그램이다.

도4a 및 도4b는 각각 겔-여과 완충용액 및 겔-여과 후의 C4 RP-HPLC 분석 크로마토그램을 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 본 발명은 친화성 크로마토그래피 공정 및 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정을 포함하는, 재조합 인체 인터페론 베타-함유 배양액으로부터 인체 인터페론 베타의 정제방법에 관한 것이다.

<6> 인터페론은 넓은 의미에서 숙주의 반응성을 매개하는 세포의 메신저로서 상대적으로 작은 크기로 세포 밖으로 분비되며 진화적으로 보존되고 있는 단백질 그룹이다. 바이러스, 이중-가닥 RNA, 각종 미생물 그리고 TNF나 IL1과 같은 사이토카인류에 의해 인터페론을 생산하는 세

포들이 인터페론을 생산하여 외부로 분비하면, 분비된 인터페론은 주변에 인터페론 수용체를 가진 세포의 표면에 결합하게 되고 그 세포의 내부에서 연쇄적인 신호 전달 작용에 의해 숙주에게 반응성과 항상성을 유지할 수 있도록 다양한 단백질들의 합성을 유도하게 된다. 그러므로 인터페론은 생체 내에서 항 바이러스성, 항 분화성, 면역 신호전달 단백질로서 작용하게 되며, 또한 암세포에 대해 직접적으로 항 분화 효과를 보임으로써 치료제로서의 관심이 매우 높다. (Postka S., Langer J. A. and Zoon K. C. (1987) *Interferons and their actions*, Annu. Rev. Biochem. 56:727-777)

<7> 인터페론은 나선형의 생리활성물질로 분류되며, 물리화학적, 기능적 특징에 따라 1형과 2형의 두 가지로 분류된다. 1형 인터페론은 알파-, 베타-, 타우-, 입실론-인터페론이 있고 (Weissman C. and Weber H. (1986) *The Interferon genes*, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 33:251-300), 2형 인터페론에는 감마 인터페론이 존재한다. 이들 중 1형 인터페론에 속하는 인터페론 베타는 종 특이적인 특성을 나타내는 단백질로서 주로 생산되는 위치에 따라 섬유모세포 인터페론(fibroblast interferon)으로도 불리며 생물학적 특성에 따라 pH2-안정성 인터페론(pH2-stable interferon)으로도 불린다. 또한 인터페론 베타는 같은 1형 그룹으로 분류되는 인터페론 알파와 세포 표면의 동일한 수용체에 결합하여 세포 내에서 일련의 신호전달 체계에 의해 항 바이러스성 인자들의 전사를 유도한다.

<8> 인터페론-베타는 대략 20%의 당을 함유한 분자량 약 20 kDa의 당단백질

(glycoprotein)로서 166개의 아미노산으로 구성된 단일사슬의 단백질이다. 1개의 N-글리코실레이션(N-glycosylation)은 생물학적 활성이나 항원성에 관여하는 것보다는 물리화학적 기능으로서 물질 자체의 안정성이나 용해성을 높이는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(Karpusas M., Whytty A., Runkel L., and Hochman P. The structure of human interferon- β : implications for activity CMLS, 54:1203-1216 1998)

<9> 유전자 재조합 기술이 발전함에 따라 사람 인터페론 베타의 아미노산 서열이 보고되고 *E.coli*에 클로닝하고 발현되었으며(Taniguchi, Gene 10:11-15, 1980), CHO 세포에서 인터페론 베타의 발현도 보고된 바 있다(USP4,966,843, USP5,376,567 및 USP5795779)

<10> 최근에 인터페론 베타는 Betaseron[®], Avonex[®], Rebif[®]라는 상품명으로 유전자 재조합 방법으로 제조되어 판매되고 있고 적응증으로서는 다발성 경화증을 가진 환자의 증상 악화와 완화의 반복되는 시기를 늦추고 통증을 감소시키는데 효과적이라고 알려져 있다. 또한 재조합 인터페론 베타는 주로 다발성경화증 치료제로 널리 이용되고 있을 뿐만 아니라 인체 면역반응의 비특이적 조절, 바이러스 감염에 대한 면역반응과 암세포의 항분화(anti-proliferation)에도 효과를 나타내고 있다.

<11> 기준에 알려진 CHO 세포 등에서 발현된 재조합 인터페론 베타의 정제방법으로는 친화성(affinity) 크로마토그래피(USP4,278,661, USP4,289,689, USP4,541,952, USP4,808,523 등), 금속-킬레이트 크로마토그래피(USP4,257,938, USP4,359,389, USP4,541,952, USP5,244,655 등), CPG (controlled pore glass) 크로마토그래피(USP4,359,389, USP5,066,786, USP5,244,655 등), 콘카나발린 A(Concanavalin A) 크로마토그래피(USP4,289,689, USP4,658,017 등)등에 의해서 1차 정제를 수행하고, 양이온 교환 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피 방법들과 조합하여 3-5 단계의 공정으로 정제하는 방법이 알려져 있다.

<12> 상기 종래의 정제방법에 있어서, 금속 칼레이트 크로마토그래피 방법을 이용할 경우에는 정제공정에 중금속이 이용되므로 환경 오염 문제가 야기될 수 있으며, CPG 및 콘카나발린 A 크로마토그래피는 정제 특이성이 떨어지는 문제점이 있다. 즉, 예를 들어 CHO 세포 배양액에는 많은 당쇄 단백질을 포함하고 있는데, 당쇄가 결합된 단백질과 선택적으로 결합하는 콘카나발린 A 크로마토그래피는 특이성이 떨어지게 되며, CPG 컬럼은 단백질과 결합한 후 크기 차이에 따라 분리할 수 있으나, 인터페론 베타에 대한 분리 효율과 순도면에서는 오히려 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 블루 세파로스 컬럼 크로마토그래피) 보다 낫다.

<13> 또한, 친화성 크로마토그래피를 이용한 종래의 정제방법은 단일클론항체를 사용하거나 및/또는 색소-수지를 이용하여 에틸렌 글리콜로 세척 및 용출시켜 크로마토그래피 공정을 수행 한다. 그러나, 단일클론항체를 비-글리코실레이션된 인터페론 제거공정을 별도로 수행하여야 하므로, 대량생산에 적용하기가 곤란하며, 특히 세척 및 용출시 사용하는 에틸렌 글리콜은 생체에 대한 독성이 매우 강하여, 실제 생산에 적용하는데 많은 한계를 보인다.

<14> 한편, 미국특허 제4,483,849호는 상기 친화성 크로마토그래피 공정에서 유독성의 에틸렌 글리콜 대신 프로필렌 글리콜을 사용하여 인터페론을 정제 및 안정화시키는 방법을 개시한 바 있다. 미국특허 제4,483,849호의 제조방법은 평형화된 Affi-Gel Blue 등의 색소-친화성 컬럼에 인터페론을 포함하는 배양액을 적용하고, 1.0M NaCl/PO₄ 완충용액 및 40% 프로필렌 글리콜로 이루어진 1.0M NaCl/PO₄ 완충용액으로 세척하고, 50% 프로필렌 글리콜로 인터페론을 용출시킨다.

<15> 그러나, 미국특허 제4,483,849호의 제조방법에 따라, 즉 NaCl/PO₄ 완충용액 및 40% 프로필렌 글리콜을 함유한 1.0M NaCl/PO₄ 완충용액으로 컬럼을 세척하고, 50% 프로필렌 글리콜 용

액을 사용하여 용출시키는 공정을 수행하더라도, 얻어지는 최종 생성물에 불순물 피크가 여전히 존재함으로써 순도가 저하된다는 문제점이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<16> 본 발명은 상기 종래기술의 문제점들을 해결하기 위한 것으로, 본 발명은 무독성의 프로필렌 글리콜을 이용하고 개선된 친화성 크로마토그래피 방법을 통하여 인터페론 베타의 일차 정제산물을 높은 순도로 회수하고, 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정 등을 포함하는 인터페론 베타의 정제방법을 제공한다.

<17> 따라서, 본 발명은 친화성 크로마토그래피 공정 및 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정을 포함하는 재조합 인체 인터페론 베타-함유 배양액으로부터 인체 인터페론 베타의 정제방법에 있어서, 특정 완충용액을 사용한 세척공정 및 용출공정을 포함하는 인체 인터페론 베타의 정제방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<18> 본 발명은 친화성(affinity) 크로마토그래피 공정 및 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정을 포함하는 재조합 인체 인터페론 베타(recombinant human interferon beta)-함유 배양액으로부터 인체 인터페론 베타(human interferon beta)의 정제방법에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 공정이 평형화된 친화성 크로마토그래피 컬럼에 인터페론 베타-함유 배양액을 가하여 흡착시킨 다음, 평형용 완충용액으로 세척하는 단계; 30 ~ 60 중량%의 프로필렌 글리콜로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 A) 및 10 ~ 30 중량%의 프로필렌 글리콜 및 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 B)으로 컬럼을 세척하는 단계; 및 40 ~ 60 중량%의 프로필렌 글리콜 및 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액으

로 인체 인터페론 베타를 함유하는 분획을 용출시키는 단계를 포함하는 인체 인터페론 베타의 정제방법을 제공한다.

<19> 본 발명의 정제방법에서 시료로서 사용되는 재조합 인체 인터페론 베타-함유 배양액은 인터페론 베타를 생성하는 세포, 균주 등의 배양물을 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, Carter and Horoszewicz, Pharm. Ther. 8, 359-377, 1980; Strander and Cantell, Ann. Med. Exp. Fenn. 44, 265-273, 1966; Wheelock, Science, 149, 310-311, 1965 등의 공지의 방법에 따라 얻어진 배양액을 사용할 수 있다. 바람직하게는 재조합 인체 인터페론 베타를 생성하는 CHO 세포(Chinese Hamster Ovary cell)의 무혈청(serum-free) 배양물을 사용할 수 있다.

<20> 본 발명의 제조방법에서, 친화성 크로마토그래피 공정에 사용되는 친화성 컬럼으로는 통상의 색소-친화성(dye-affinity) 컬럼을 사용할 수 있으며, 예를 들어, 블루-세파로스 6(Blue-Sepharose6, Amersham biosciences사, 스웨덴)를 컬럼(예를 들어, XK-50 컬럼, Amersham biosciences사, 스웨덴)에 충진시킨 컬럼 또는 Affi-Gel Blue 컬럼(Bio-Rad사, 미국) 등을 사용할 수 있다. 상기 친화성 컬럼의 평형용 완충용액으로는 EDTA를 첨가한 소듐 포스페이트 완충용액(약 pH 7.2)의 완충용액을 사용할 수 있으며, 통상의 방법으로 예를 들어 약 15 ~ 30 cm/hr의 선속도로 3 컬럼부피(column volume) 정도로 흘려 평형시킬 수 있다.

<21> 본 발명의 제조방법에서, 친화성 크로마토그래피 공정은 평형화된 친화성 크로마토그래피 컬럼에 인터페론 베타-함유 배양액을 가하여 흡착시킨 다음, 평형용 완충용액으로 비특이적으로 결합된 단백질을 세척하는 단계를 포함한다.

<22> 또한, 친화성 크로마토그래피 공정은 다단계 세척단계 즉, 30 ~ 60 중량%의 프로필렌 글리콜로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 A) 및 10 ~ 30 중량%의 프로필렌 글리콜 및 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 B)으로 컬럼을 세

척하는 단계를 포함한다. 또한, 상기 세척단계는 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 C)으로 세척하는 단계를 더욱 포함하는 것이 바람직하다. 상기 각 세척단계는 2 ~ 4의 컬럼부피(column volume)의 완충용액을 사용하여 수행되는 것이 바람직하다.

<23> 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 세척단계에서 각 세척용 완충액은 순서와 무관하게 적용할 수 있다. 즉, 세척용 완충액 A로 세척한 다음 세척용 완충액 B로 세척하거나, 세척용 완충액 B로 세척한 다음 세척용 완충액 A로 세척할 수 있으며, 또한, 세척용 완충액 A로 세척한 다음 세척용 완충액 C로 세척한 후 세척용 완충액 B로 세척하거나, 세척용 완충액 B로 세척한 다음 세척용 완충액 C로 세척한 후 세척용 완충액 A로 세척할 수도 있다. 상기 세척과정에서, 세척용 완충액 A에 의해 소수성이 높은 불순 단백질이 효과적으로 제거되며, 세척용 완충액 C에 의해 친수성 불순물이 제거되고, 다시 세척용 완충액 B에 의해 불순 단백질이 제거되게 된다.

<24> 또한, 인터페론 베타의 회수는 40 ~ 60 중량%, 더욱 바람직하게는 50중량%의 프로필렌 글리콜 및 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액으로 인체 인터페론 베타를 함유하는 분획을 용출시킴으로써 수행될 수 있다.

<25> 상기 각 세척 및 용출단계에서 사용되는 완충용액으로는 소듐 포스페이트 완충용액(sodium phosphate buffer) 또는 칼륨 포스페이트 완충용액(potassium phosphate buffer)을 바람직하게 사용할 수 있다.

<26> 미국특허 제4,483,849호에서 개시한 방법이 단계적인 프로필렌 글리콜 농도 구배에 따라 세척 및 용출시키는 공정을 채용함에 반해, 본 발명의 정제방법은 약 50% 프로필렌 글리콜을 세척공정에서 사용함으로써, 종래의 제조방법에서 나타나는 불순물 피크를 효과적으로 제거할 수 있다.

<27> 본 발명의 정제방법은 상기와 같은 친화성 크로마토그래피를 수행한 다음, 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정을 수행한다. 또한, 본 발명의 정제방법은 분자량 컷-오프 10,000의 한 외여과막을 이용하여 상기 친화성 크로마토그래피 공정으로부터 회수된 용액을 정용여과 (diafiltration)한 다음, 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정을 수행하는 것이 바람직하다. 상기 정용여과 공정을 통하여, 상대적으로 높은 염 농도의 인터페론 베타를 적절한 수준으로 조절할 수 있다.

<28> 상기 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정은 정용여과로부터 얻어진 시료를 컬럼에 가한 후, pH 2~5에서 염산과 에탄올을 사용한 농도구배로 인체 인터페론 베타를 포함하는 분획을 용출시킴으로써 수행할 수 있다. 구체적으로는, 0.1% ~ 20%, 바람직하게 5% 이하의 프로필렌 글리콜이 포함된 0.1%의 염산으로 컬럼을 평형시키고 정용여과로부터 얻어진 0.1% ~ 20%, 바람직하게 5%이하의 프로필렌 글리콜이 포함된 시료를 컬럼에 가한 후 0.1%의 염산으로 컬럼을 세척하고 0.1%의 염산을 포함하는 30~50%, 바람직하게는 45% 에탄올로부터 0.1%의 염산을 포함하는 65~90%, 바람직하게는 70% 에탄올까지 직선 농도 구배로 인터페론 베타를 포함하는 분획을 용출시킬 수 있다.

<29> 상기 역상 고속 액체 크로마토그래피 컬럼으로는 Protein C4 (bead size 10 μ m, pore size 30Å, Vydac사)등의 컬럼을 사용할 수 있으며, 약 5 CV(컬럼 부피) 정도로 흘려 평형시킬 수 있다. 정용여과된 시료를 평형화된 컬럼에 적당한 유속으로 흘려 흡착시켜 크로마토그래피 공정을 수행하며, 세척은 0.1% 염산 완충용액을 3 CV 이상 흘림으로써 수행할 수 있고, 용출은 약 10~20 CV 동안 직선 농도구배로 흘려줌으로써 불순단백질과 목적단백질을 분리 회수할 수 있다.

<30> 상기 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정을 수행한 인터페론 베타를 포함한 분획은 추가의 완충용액 교환공정을 수행할 수 있다. 완충액 교환공정은 젤 여과(gel-filtration) 또는 농축 및 정용여과(concentration and diafiltration) 등으로 수행할 수 있다.

<31> 예를 들어, 젤 여과 공정을 수행할 경우, 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정에서 분리 회수한 용액을, 예를 들어 약 200 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 농축하고 10~50 mM 소듐 아세테이트 완충 용액(pH 3.5~5.5)으로 투석한 다음, 10~50 mM 바람직하게는 20mM의 소듐 아세테이트 완충용액(pH 3.5~5.5)으로 평형시킨 젤-여과 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, Sephacryl S-200, Amersham biosciences사)에 로딩하고 적당한 유속으로 10~50 mM 소듐 아세테이트(pH 3.5~5.5) 완충용액을 흘려 목적 단백질의 용액을 교환하고 중합체를 분리 제거할 수 있다.

<32> 본 발명의 전체 공정을 단계별 흐름도로 나타내면 도1과 같다.

<33> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<34> 실시예 1. 친화성 크로마토그래피

<35> Blue-Sepharose 6 (Amersham biosciences사, 스웨덴)를 XK-50 컬럼(Amersham biosciences사, 스웨덴)에 350ml을 충진하여 친화성 크로마토그래피 컬럼으로 사용하였다. 1mM EDTA가 함유된 20 mM 소듐 포스페이트 완충용액을 충분히 흘려 컬럼을 형시킨 다음, 인터페론 베타를 포함하고 있는 CHO 세포 무혈청(serum-free) 배양액 25 L를 5 ~ 10 ml/min의 유속으로 흘린 후 다시 평형용 완충용액을 약 3 CV 정도 흘려 컬럼을 세척하였다.

<36> 50 % 프로필렌 글리콜이 함유된 20 mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 7.2)을 5 ml/min의 유속으로 약 3 CV 정도 흘려 불순 단백질들을 제거한 후, 평형용 완충용액을 약 3 CV 정도 흘

려 주었다. 다시, 2 M NaCl이 함유된 20 mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 7.2)을 5 ml/min의 유속으로 약 3 CV 정도 흘려 불순 단백질들을 제거하였다. 마지막으로 2M NaCl과 20% 프로필렌 글리콜이 함유된 20 mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 7.2)을 5 ml/min의 유속으로 약 3 CV 정도 흘려 불순단백질을 제거하였다.

<37> 목적 단백질의 회수는 용출용 완충용액(2M NaCl 및 50% 프로필렌 글리콜이 함유된 20 mM 소듐 포스페이트 완충용액, pH 7.2)를 5 ml/min의 유속으로 약 3 CV 정도 흘려 인터페론 베타를 함유한 용액을 회수하였다. 회수한 용출액의 순도를 C4 HPLC 분석 크로마토그래피를 통하여 측정한 결과는 도2와 같으며, 도2에서 확인할 수 있는 바와 같이 인터페론 베타의 순도는 약 85% 이상임을 할 수 있다.

<38> 또한, 상기 과정에서 50 % 프로필렌 글리콜이 함유된 20 mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 7.2)으로 세척하는 공정을 제거하고 동일한 방법으로 친화성 크로마토그래피를 수행하였으며, 얻어진 용출액의 순도를 C4 HPLC 분석 크로마토그래피를 통하여 측정한 결과는 도3과 같다. 도3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 세척공정을 수행하지 않을 경우, 순도가 크게 저하되는 것을 알 수 있다.

<39> 실시예 2. 역상 고속 액체 크로마토그래피

<40> 실시예1에서 얻은 인터페론 베타를 함유한 용액을 한외 여과 시스템(분자량 컷 오프 10,000)을 이용하여 정용여과(diafiltration)를 수행한 다음, 시료를 역상 고속 액체 크로마토그래피(Protein C4, bead size 10 μ m, pore size 30Å, Vydac사) 컬럼에 2 ml/min의 유속으로 흘려 흡착시킨 후 0.1% 염산 완충용액(pH 2.1)을 약 3 CV 정도 흘려 세척하였다. 인터페론 베타의 용출은 0.1% 염산 A용액과 0.1% 염산이 포함된 90% 에탄올 B 용액을 사용하여 B 용액 45%

부터 B 용액 80%까지 직선 농도 구배로 20 CV 동안 흘려주어 불순단백질과 목적단백질을 분리 회수하였다.

<41> 실시예 3. 겔-여과 크로마토그래피

<42> 실시예 2에서 회수된 인터페론 베타 용액을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 농축하고, 분획에 포함된 에탄올을 20 mM 소듐 아세테이트 완충용액(pH 4.0)으로 500배 이상 교환한 후 20 mM 소듐 아세테이트 완충용액(pH 4.0)으로 미리 평형시킨 세파크릴(Sephacryl) S-200 컬럼 (1700ml, XK-50/100, Amersham biosciences사, 스웨덴)에 적용하여 인터페론 베타를 포함한 용액을 얻었다.

<43> 실시예 4. 역상 고압 액체 크로마토그래피법 (RP-HPLC)에 의한 분석

<44> 실시예 1, 2, 및 3에서 회수한 용액을 C4 RP-HPLC(Vydac 214TP54, 내경 4.6mm x 길이 25 cm, 입자크기 5 μm , 다공크기 300Å) 컬럼에 1ml/min의 유속으로 주입한 다음 0.1%의 트리플루오로아세트산을 포함하는 30% 아세토나이트릴에서 0.1%의 트리플루오로아세트산을 포함하는 80% 아세토나이트릴까지 20배 컬럼 부피만큼 직선 농도구배 조건으로 흘리며 나타나는 크로마토그램의 패턴을 분석하였다.

<45> 겔-여과 크로마토그래피 완충용액과 겔-여과 크로마토그래피 후의 분석 결과는 도4a 및 도4b과 같다. 도4a 및 도4b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 의해 인터페론 베타를 순수하게 정제할 수 있음을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<46> 본 발명의 정제방법은 무독성의 프로필렌 글리콜을 이용하고 개선된 친화성 크로마토그래피 방법을 통하여 인터페론 베타를 99% 이상의 높은 순도로 정제할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

친화성(affinity) 크로마토그래피 공정 및 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정을 포함하는 재조합 인체 인터페론 베타(recombinant human interferon beta)-함유 배양액으로부터 인체 인터페론 베타(human interferon beta)의 정제방법에 있어서,

상기 친화성 크로마토그래피 공정이 평형화된 친화성 크로마토그래피 컬럼에 인터페론 베타-함유 배양액을 가하여 흡착시킨 다음, 평형용 완충용액으로 세척하는 단계;

30 ~ 60 중량%의 프로필렌 글리콜로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 A) 및 10 ~ 30 중량%의 프로필렌 글리콜 및 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 B)으로 컬럼을 세척하는 단계; 및

40 ~ 60 중량%의 프로필렌 글리콜 및 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액으로 인체 인터페론 베타를 함유하는 분획을 용출시키는 단계를 포함하는 인체 인터페론 베타의 정제방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 세척하는 단계가 1~2M의 NaCl로 이루어진 pH 6.5~7.5의 완충용액(세척용 완충액 C)으로 세척하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 정제방법.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 각 세척 및 용출단계에서 사용되는 완충용액이 소듐 포스페이트 완충용액(sodium phosphate buffer) 또는 칼륨 포스페이트 완충용액(potassium phosphate buffer)인 것을 특징으로 하는 정제방법.

【청구항 4】

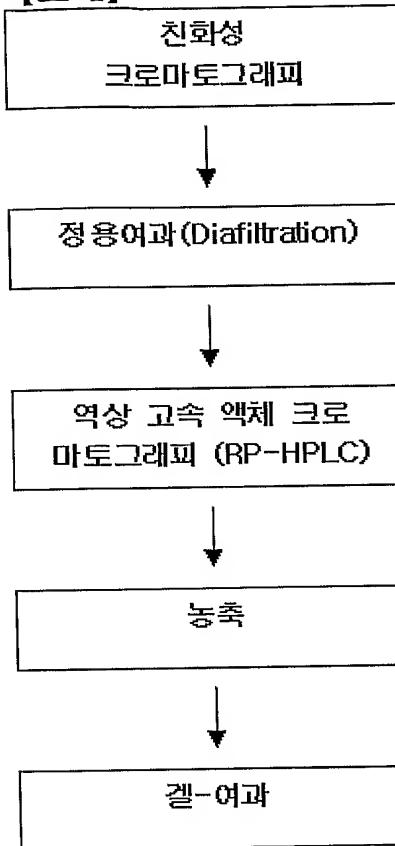
제1항 또는 제2항에 있어서, 분자량 컷-오프 10,000의 한외여과막을 이용하여 상기 친화성 크로마토그래피 공정으로부터 회수된 용액을 정용여과(diafiltration)한 다음, 상기 역상고속 액체 크로마토그래피 공정을 수행하는 것을 특징으로 하는 정제방법.

【청구항 5】

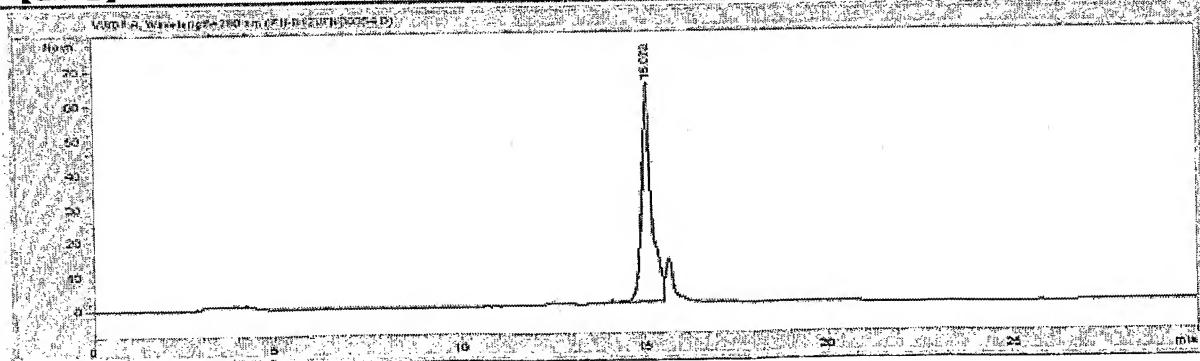
제4항에 있어서, 상기 역상 고속 액체 크로마토그래피 공정이 정용여과로부터 얻어진 시료를 컬럼에 가한 후, pH 2~5에서 염산과 에탄올을 사용한 농도구배로 인체 인터페론 베타를 포함하는 분획을 용출시키는 것을 특징으로 하는 정제방법.

【도면】

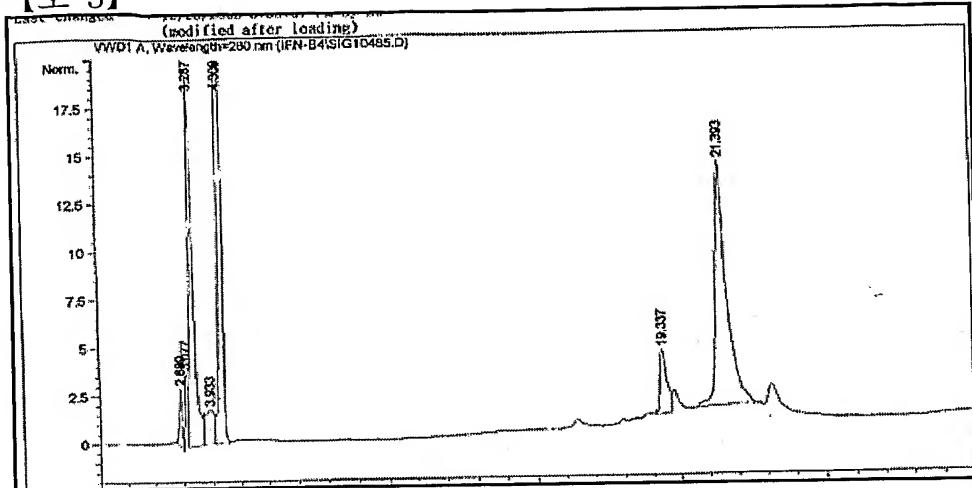
【도 1】



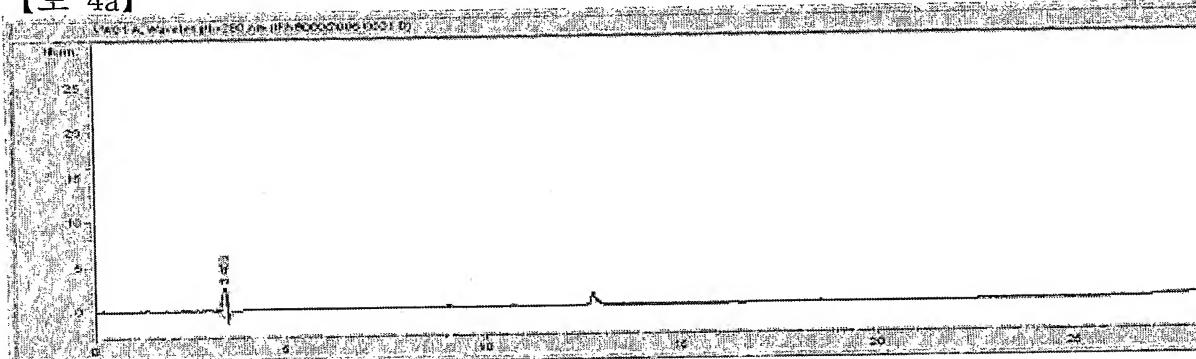
【도 2】



【도 3】



【도 4a】



【도 4b】

